Résumé de thèse

Utilisation des outils de la génomique expressionnelle pour l'étude de la différenciation sexuelle chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, par Daniel BARON (1).

Thèse de doctorat, mention Biologie, Université de Rennes 1, 2005, 153 p., 13 figs, 2 tabs, 131 réfs.

La possibilité de contrôler le sexe chez les poissons apporte, pour de nombreuses espèces, un avantage économique important en pisciculture du fait de dimorphismes sexuels portant sur différents caractères zootechniques d'intérêt. Des techniques efficaces de production de populations entièrement mâles ou femelles reposent sur des traitements stéroïdiens, mais les mécanismes d'action de ces traitements ainsi que régulations physiologiques de la différenciation des gonades, impliquant en particulier les stéroïdes sexuels, sont peu connus. Le travail présenté dans cette thèse visait, par des analyses de transcriptomes, à identifier les gènes sous-jacents à ces processus. Après une analyse approfondie de la littérature portant sur les gènes liés à un rôle potentiel des stéroïdes dans la différenciation sexuelle des vertébrés, une première expérience d'analyse, par PCR en temps réel, des expressions d'une centaine de gènes candidats dans les gonades embryonnaires de truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, est présentée. Une cinétique de six points de prélèvement, accompagnée d'examens histologiques systématiques, a permis de suivre l'évolution des expressions à partir de l'éclosion (J0) jusqu'à 110 jours (J0+110). Une exploitation des données utilisant une méthode de regroupement hiérarchique et un traitement statistique, classiquement utilisés pour traiter des données de réseaux d'ADNc, met en évidence des contrastes entre ovaire et testicule, d'une part, et entre période de différenciation (J0 à J27) et initiation de la gamétogenèse (J60 à J110), d'autre part. Des groupes de gènes, dont le rôle fonctionnel est discuté, ont par ailleurs pu être identifiés. L'un de ces gènes, 'forkhead box L2' (*Foxl2*), a fait l'objet d'une étude particulière chez la truite, confirmant sa grande conservation au sein de tous les vertébrés. Deux paralogues indépendants ont été identifiés chez la truite, leur expression étant stimulée par les oestrogènes. Ces résultats sont discutés en termes de conservation possible, au cours de l'évolution, d'un rôle des oestrogènes dans la différenciation ovarienne. Enfin, une analyse transcriptomique à haut débit a été développée en utilisant des réseaux d'ADNc (10 000 clones déposés sur membranes de nylon), et en bénéficiant des ressources biologiques du programme AGENAE de l'INRA. Dans ce cadre, l'attention a été focalisée sur l'effet d'une traitement d'inversion par les androgènes. Un millier de gènes ont été repérés comme pertinents pour une analyse plus approfondie, et 14 groupes de gènes, associés par des profils d'expression similaires, ont été constitués pour des interprétations fonctionnelles. L'ensemble de ce travail permet de conclure : (1) à une forte conservation d'acteurs de la différenciation sexuelle des gonades entre poissons et mammifères, (2) à un rôle important de gènes liés à l'action des oestrogènes dans la différenciation ovarienne, (3) à un effet masculinisant des androgènes passant, au moins, par une inhibition des régulations associées aux oestrogènes.

Summary. - Transcriptomic tools (microarrays) applied for the study of gonadal sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

The possibility of controlling the sex in fish represents, for many species, a significant economic advantage in pisciculture because of sexual dimorphisms relating to various zootechnical characters of interest. Effective techniques of production of either male or female populations are based on steroid treatments, but the mechanisms of action of these treatments like physiological regulations of gonade differentiation, implying sexual steroids in particular, are poorly understood. The work presented in this thesis aimed, using analyses of transcriptome, to identify genes subjacent to these processes. After a bibliographic analysis of genes having a potential role with steroids in sexual differentiation in vertebrates, a first experiment of analysis, using real time PCR, of the expressions of a hundred candidate genes in the embryonic rainbow trout gonads, *Oncorhynchus mykiss*, is presented. Kinetics of six sampling points, accompanied by histological examinations, allowed to follow the evolution of the expressions starting from the first feeding (J0) up to 110 days (J0+110). An exploitation of the data using a method of hierarchical clustering and a statistical processing, classically used to treat data of networks of ADNc, highlights contrasts between ovary and testis, on the one hand, and between period of differentiation (J0 in J27) and initiation of gametogenesis (J60 with J110), on the other hand. Groups of genes, whose functional role is discussed, in addition could be identified. One of these genes, 'forkhead box L2' (*Foxl2)*, was the subject of a particular study in trout, confirming its high conservation in vertebrates. Two independent paralogs were identified in trout, and their expression is stimulated by oestrogens. These results are discussed in terms of possible conservation, during vertebrate evolution, of a role of the oestrogens in ovarian differentiation. Lastly, a high throughput analysis was developed by using microarrays (10,000 clones deposited on nylon membranes) and benefiting from the resources of the INRA AGENAE program. Within this framework, we focused on the effect of a inversing treatment the androgens. A thousand of genes were located as relevant for subsequent analysis, and 14 groups of genes, associated by similar profiles of expression, were made up for functional interpretations. This work revealed: (1) a strong conservation of actors of sexual differentiation of the gonads between fish and mammals, (2) a significant role of genes related to the action of oestrogens in ovarian differentiation and, (3) a masculinising effect of androgens mediated, at least, by an inhibition of the regulations associated with the oestrogens.

Key words. - Salmonidae - *Oncorhynchus mykiss* - Gonad - Ovary - Testis - Early development - Sex differentiation - Sex inversion - Steroid hormones - Estrogens - Androgens - Gene regulation - Genomics - Transcriptome.

(1) Institut du Thorax, INSERM UMR 915, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, BP 53508, 44035 Nantes CEDEX 1, FRANCE. [daniel.baron@univ-nantes.fr]